一株苏云金杆菌噬菌体的形态结构及其蛋白质性质

王卫国，孙富林
（中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071）

摘要：从武汉微生物药厂苏云金杆菌发酵裂解液中分离到1株具有独特形态结构的苏云金杆菌噬菌体GP-1。电镜观察发现，这株噬菌体的头部呈长六棱柱状，具一短直尾和一"衣领"状结构，并首次发现了"衣领"状结构是由8～10个颗粒亚单位组成。该株噬菌体所具有的这8～10个颗粒亚单位对于噬菌体牢固地吸附于宿主表面应具有很强的促进作用，对于进一步研究噬菌体与宿主之间的关系提供一个结构上的证据。该株噬菌体的蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定，呈现一条主带，分子量为58 892 D，一条次主带和七条次带，表明该株噬菌体的蛋白是由9种蛋白质构成。

关键词：苏云金杆菌；噬菌体；形态结构；蛋白质
中图分类号：Q936；S476 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）01-0006-05

The novel morphology and structure of *Bacillus thuringiensis* bacteriophage GP-1 and its protein properties

WANG Wei-Guo，SUN Fu-Lin（Institute of Virology，Chinese Academy of Sciences，Wuhan 430071，China）

Abstract：A bacteriophage，GP-1 of *Bacillus thuringiensis*，with unique morphology and structure was isolated from the lytic fermentation liquor of *Bacillus thuringiensis* at Wuhan Microbial Pesticides Factory. Examination by JEM-100C electron microscope revealed that each phage has a long，six-sided head with short tails and a plate-like collar structure with 8－10 appendages attached to the base of the head. The 8－10 appendages can greatly enhance the adsorption of the phage to the surface of the host and provide structural evidence for the further study of the relationships between this phage and its host. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis indicated that this phage has one major protein band，MW＝58 892 D，one sub-major protein band and seven minor protein bands. These results indicate that nine kinds of proteins comprise the protein content of phage GP-1.

Key words：*Bacillus thuringiensis*；bacteriophages；morphology；protein

生物防治是指利用活的有益的生物体、菌体或微生物的代谢产物以防治农业病、虫、草害的方法。近年来，生物防治在国外发展很快，在现代生物工程领域中，它是一个极其重要的部分，已得到广泛的开发和应用。在生物防治领域，研究与开发最为广泛的当首推苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis*（Bt）。因为Bt作为杀虫剂，具有使用安全、对人畜无害、连续使用害虫不易产生抗药性、无残毒、不污染环境、不杀伤天敌、成本低、杀虫范围广和药效持久等特点。所以，Bt具有很大的研究价值和巨大的开发潜力，它是保护自然界生态平衡、实现可持续性发展的重要生防因子之一。

国内外对Bt的研究主要集中于Bt毒素及其杀虫蛋白基因的转移上，且已取得许多重大突破，如转基因棉花、水稻、蕃茄的成功。目前已进行过600多个田间试验并注册了20多种Bt转基因植物，但转基因植物由于其易使害虫产生抗药性，易攻击其它目标并有可能破坏生态平衡而引起了国际同行专家的极大关注（Mikkelsen，1996；Timmons，1996；William，1998；Hoflack *et al*.，1999）。近年来，从工业发酵角度来研究开发Bt已引起许多国家政府部门、学者和公司的重视，但在菌剂的发酵生产中，由于经常出现噬菌体的污染，以致倒罐，造成生产上巨大的经济损失。国内外对这类噬菌体曾进行了一些研究（Colasito and Rogoff，1969；Jones *et al*.，1983；朱素娟等，1997；王卫国等，2000），但多限于形态学和血清学的水平。本研究通过电子显微镜观察首次发现了一株具有8～10个颗粒亚单位

作者简介：王卫国，男，39岁，硕士，副教授，现在南阳理工学院生物与化学工程系从事生物技术研究与教学工作，E-mail：wgwwang@163.net；Tel：0377-3120387
收稿日期 Received：2001-09-03；接受日期 Accepted：2002-10-13

结构的 Bt 噬菌体，并从分子水平上对其蛋白性质进行了探讨。

1　材料与方法

1.1　指示菌和噬菌体

指示菌：苏云金杆菌腊螟变种 *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* 由广东省微生物所提供；噬菌体 GP-1 分离自武汉微生物药厂苏云金杆菌发酵裂解液。

1.2　培养基

采用营养肉汁琼脂培养基。其配方为每升培养基中含有：牛肉膏 3 g，蛋白胨 5 g，氯化钠 5 g，pH 7.0。上层和下层培养基分别各加 10 g 和 20 g 琼脂。

1.3　试剂

氯化铯（CsCl）、十二烷基磺酸钠（SDS）及丙烯酰胺为 Sigma 公司产品；磷酸化酶 b（Phosphorylase b），牛血清蛋白（BAS），母鸡卵清蛋白（Hen egg white oval bumin），牛碳酸脱水酶（Bovine carbonic anhydrase），大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean trypsin inhibitor），鸡蛋清溶菌酶（hen egg white lysozyme）为 Bio-Rad 产品；聚乙二醇（PEG6000）及琼脂为日本进口分装；蛋白胨（多胨）为日本化学工业公司产品。

1.4　噬菌体 GP-1 的单斑纯化及大量制备

按王卫国等（2000）的方法进行。各取少许制备的噬菌体上清液，按 Adams（1959）的双层法倒平板，测效价。

1.5　噬菌体的浓缩和纯化

采用两种方法：（1）甘油梯度离心按 Yamamoto 等（1970）和 Maniatis 等（1992）的方法进行。（2）CsCl 密度梯度离心按蔡良婉（1987）的方法进行。

1.6　噬菌体的纯度鉴定

采用两种方法：（1）紫外吸收法。取少许超离心提纯的病毒悬液进行适当稀释，用 UV-300 型双光束分光光度计扫描，并记录最高和最低吸收峰。（2）电镜观察法。首先采用悬滴法（朱明霞，1987）制片。取超离心提纯的噬菌体悬液滴于覆有聚乙烯甲醛膜（Formvar）的铜网上少许，以 2% 磷钨酸（PTA）（pH 7.0）染色 5 ~ 10 min，将铜网放于干燥滤纸上，自然干燥。然后用日立 JEM-100C 型电镜，在加速电压为 80 kV，放大 75 900、82 500、165 500 倍的条件下观察。

1.7　十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）

取 40 μL 经氯化铯（CsCl）密度梯度离心提纯的噬菌体液，加 40 μL 二倍浓的样品缓冲液（0.1 $mol\cdot L^{-1}$ Tris-HCl pH 6.8，2% SDS，25% 甘油，10% 巯基乙醇，0.0025% 溴酚蓝），100℃ 煮沸 5 min；制备 10% 胶；用 Laemmli（1974）不连续系统电泳。电压 48 V，温度 12℃左右电泳 7 h 后，用考马斯兰 R_{250} 染色（张龙翔等，1985）。用于测定的标准蛋白分子量（MW）为磷酸化酶 b（Phosphorylase b）97 400，牛血清蛋白（BAS）66 200，母鸡卵清蛋白（Hen egg white oval bumin）42 699，牛碳酸脱水酶（Bovine carbonic anhydrase）31 000，大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean trypsin inhibitor）21 500，鸡蛋清溶菌酶（hen egg white lysozyme）14 400。

1.8　噬菌体多肽成分的 UV 扫描分析

将 SDS-PAGE 后的凝胶切割成胶条，用 UV-300 型双光束分光光度计进行扫描。

2　结果

2.1　噬菌体的提纯

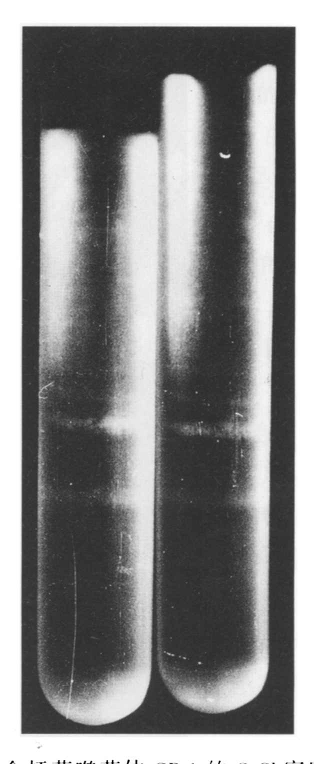


图 1　苏云金杆菌噬菌体 GP-1 的 CsCl 密度梯度离心

Fig.1　Density gradient centrifugation of phage GP-1 of *Bacillus thuringiensis* by CsCl

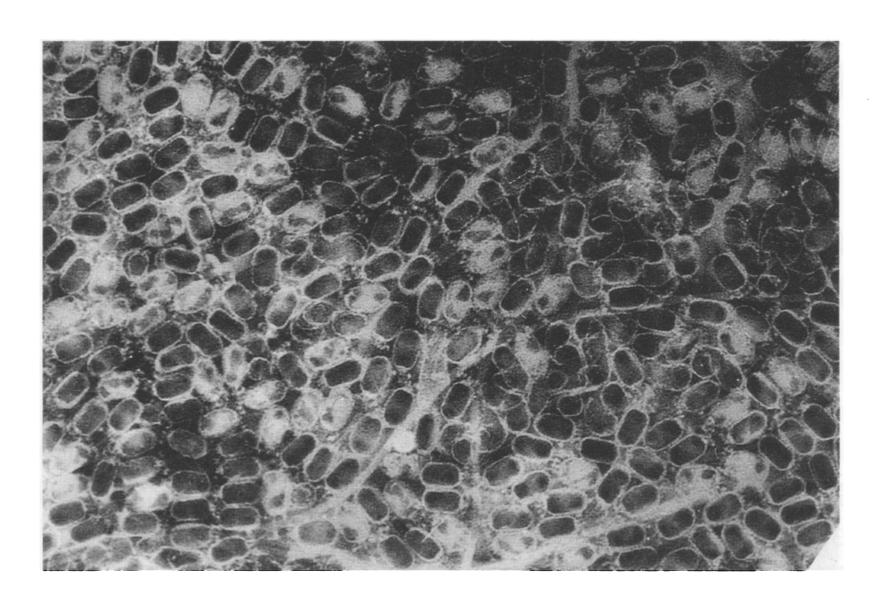


图 2 空壳苏云金杆菌噬菌体 GP-1 的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of phage GP-1 without nucleic acids of *Bacillus thuringiensis*（75 900 × ）

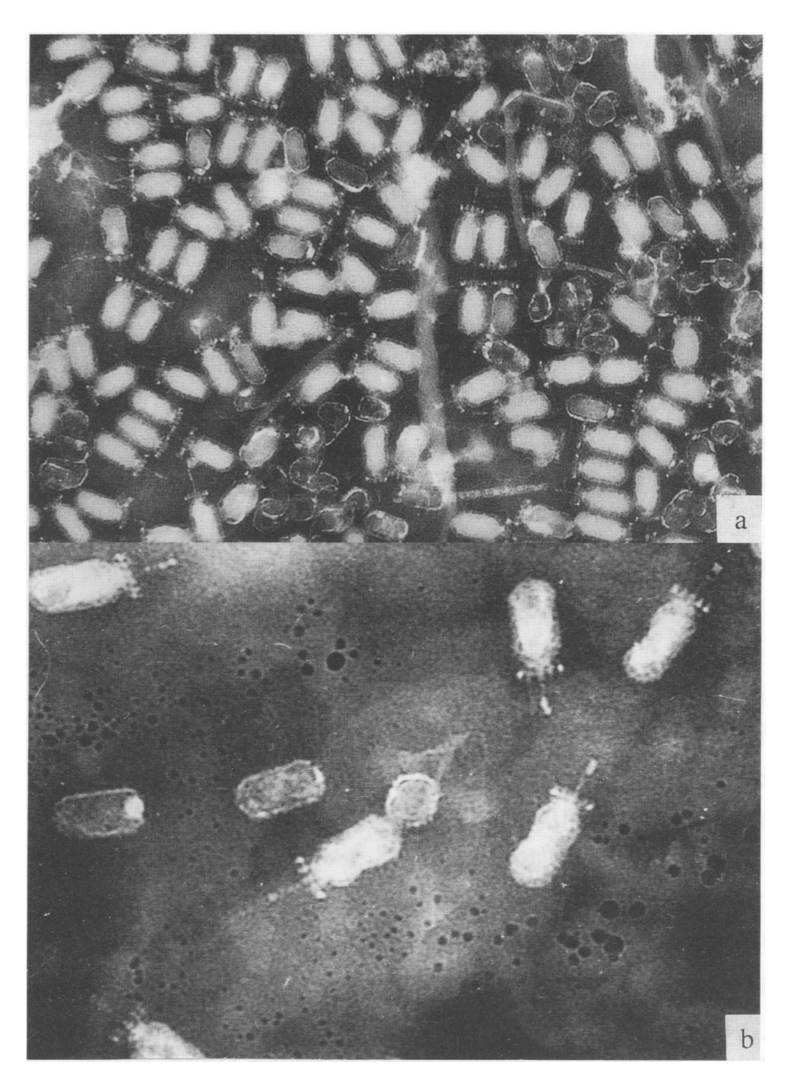


图 3 完整苏云金杆菌噬菌体 GP-1 的形态和结构

Fig.3 Morphological characteristics and structure of phage GP-1 of *Bacillus thuringiensis*

a：82 500 × ；b：165 500 ×

对提纯的噬菌体采用Adams双层平板法测定，得其效价为：1.85×10^{12} PFU/mL。经UV扫描分析，该株噬菌体紫外吸收峰，其最高峰在262 nm处，最低峰在242 nm处，为典型的核蛋白吸收曲线。

CsCl密度梯度离心的结果，在离心管上出现2条带（从管口至管底依次编为1号、2号），1号带呈现在1.35 g/cm^3，2号带呈现在1.45 g/cm^{3}密度层的中部（图1）。电镜观察可以看出，1号带是由噬菌体空壳组成（图2），2号带是由完整的噬菌体组成（图3：a，b）。

2.2　噬菌体的形态和结构

纯化后的噬菌体在电镜下呈长六棱柱状，具一短直尾和一“衣领”状结构，“衣领”状结构是由对称的8～10个短棒状结构组成（图3：b；表1）。

表1　噬菌体的形态和大小

Table 1　Morphological characteristics and size of Bt phage GP-1

噬菌体 Phage	宿主 Host	头部 Head（nm）	尾部 Tails（nm）	“衣领”状结构 Collar structure（nm）
		长六棱柱状 Elongated six-sided prismatic outline	直尾较短，无鞘 Short non-contractile，no sheath	由8～10个颗粒亚单位组成 With 8～10 appendages
GP-1	*B. thuringiensis* var. *galleriae*	75～83×44～46	36～39×4.5～4.9	45～48×11～13

2.3　噬菌体GP-1的蛋白组成及分子量大小

噬菌体GP-1的蛋白经SDS-PAGE的结果表明，提纯的噬菌体呈现出一条主带，一条次主带，另外还各有7条次带（图4）。以磷酸化酶b（Phosphorylase b）97 400 D，牛血清蛋白（BAS）66 200 D，母鸡卵清蛋白（Hen egg white oval bumin）42 699 D，牛碳酸脱水酶（Bovine carbonic anhydrase）31 000 D，大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean trypsin inhibitor）21 500 D，鸡蛋清溶菌酶（hen egg white lysozyme）14 400为分子量标准测得噬菌体GP-1蛋白的分子量的大小依次为主带58 892 D，8条次带：79 435 D，75 856 D，69 187 D，65 312 D，55 593 D，53 090 D，48 981 D，45 712 D。

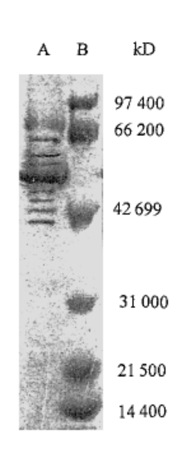


图4　噬菌体GP-1蛋白的SDS-PAGE

Fig.4　SDS-PAGE patterns of proteins of Bt phage GP-1

A：GP-1；B：marker proteins

噬菌体GP-1蛋白的SDS-PAGE凝胶经UV扫描分析，出现一个主峰，一个次主峰，另外还各有7个次（小）峰，与SDS-PAGE的结果一致，进一步证实了该株噬菌体是由9种蛋白质组成。

3　讨论

据介绍，武汉微生物药厂在生产生物防治农药Bt的过程中，时常有发酵液变稀的现象，作者就现场取样，对来自武汉微生物药厂的苏云金杆菌发酵裂解液进行了分析探讨。首先是挑单斑、分离、纯化，纯化后的噬菌斑呈透明圆形，无晕圈，其直径为3.1～3.6 mm。然后把纯化后的噬菌体上摇床扩增培养以制备大量的纯净噬菌体，最后放在电镜下观察。结果发现，该株苏云金杆菌噬菌体有一长六棱柱状的头部，一短直尾和一“衣领”状结构。值得一提的是本研究首次发现了噬菌体的“衣领”状结构是由8～10个颗粒亚单位组成。该株苏云金杆菌噬菌体所具有的这8～10个颗粒亚单位对于噬菌体牢固地吸附于宿主表面应具有很强的促进作用，对于进一步研究噬菌体与宿主之间的关系提供一个结构上的证据。这种结构是否有利于噬菌体把其DNA射入宿主体内以及是否还有其它功能，有待于进一步探讨。

从蛋白组成看，苏云金杆菌噬菌体GP-1是由9种蛋白质组成，与文献（Matthews，1985）中的约12种蛋白不同，少了3种；从蛋白质分子量的大小来分析，该株噬菌体蛋白分子量均约等于45 000

~79 000 D，在文献（Matthews，1985）所述范围之内。但该株噬菌体主要衣壳蛋白的分子量约为58 000 D，比文献（Matthews，1985）报道的约38 000 D要大20 000 D。主要衣壳蛋白的分子量大小为什么会有这么大的差异？这种差异在噬菌体的生理功能上会有何特殊表现值得进一步研究。

苏云金杆菌的伴孢晶体蛋白与苏云金杆菌噬菌体蛋白，对于苏云金杆菌菌体本身来说都是比较重要的，而且从某种意义上来说，后者对Bt的影响要比前者大的多。但由于苏云金杆菌的伴孢晶体蛋白的良好杀灭害虫的特性而引起学术界的普遍关注，不仅已把苏云金杆菌的伴孢晶体蛋白基因转移到多种农作物体内，而且还发现苏云金杆菌的伴孢晶体蛋白的杀虫活性与芽孢量的多少具有相关性。那么，苏云金杆菌的噬菌体蛋白除了作为噬菌体的组成部分，除了可以参与裂解宿主之外，是否也具有杀灭害虫的特性，是值得进一步探讨的。苏云金杆菌的伴孢晶体蛋白与苏云金杆菌噬菌体蛋白是否具有结构、功能上的相关性正待进一步研究。

参 考 文 献（References）

Adams M H，1959. Bacteriophages. New York: Interscience Publishers，Inc.

Cai L W，1987. Technological Study on Nucleic Acids (1). Beijing: Science Press.［蔡良婉，1987. 核酸技术研究（上）. 北京：科学出版社］

Colasito D J，Rogoff M H，1969. Characterization of lytic bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. *J. Gen. Virol.*，5: 267－274.

Hoflack L，Wilcks A，Andrup L，Mahillon J，1999. Functional insights into pGI2，a cryptic rolling-circle replicating plasmid from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*，145: 1 519－1 530.

Jones D R，Karunakaran V，Burges H D，1983. Phages naturally associated with the aizawai variety of insect pathogen *Bacillus thuringiensis* and their relevance to strain identification. *J. Appl. Bacterio.*，54: 373－377.

Laemmli U K，1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature*，227: 680－685.

Maniatis T，Fritsch E F，Sambrook J，1992. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory，New York: Interscience Publishers，Inc.

Matthews R E F，1985. Classfication and Nomenclature of Viruses: Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Karger S: Science Publishers.［廖延雄译，1987. 病毒的分类与命名，国际病毒分类委员会第四次报告. 北京：科学出版社］

Mikkelsen T R，1996. The risk of crop transgene spread. *Nature*，380: 31.

Timmons A M，1996. Risks from transgene crops. *Nature*，380: 487.

Wang W G，Zha Y J，Sun F L，2000. Comparison of nucleic acid characteristics of three *Bacillus thuringiensis* bacteriophages. *Chinese Journal of Biological Control*，16 (2): 69－73.［王卫国，闸远钧，孙富林，2000. 3株苏云金杆菌噬菌体的核酸性质. 中国生物防治，16（2）：69－73］

William H，1998. Managing insect resistance to Bt toxins. *Science*，258 (27): 1 451.

Yamamoto K R，Bruce M A，Rolf B *et al.*，1970. Rapid bacteriophages sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*，40: 734－741.

Zhang L X，Zhang T F，Li L Y，1985. Experimental Method and Technology for Biochemistry. Beijing: Higher Education Press.［张龙翔，张庭芳，李令媛，1985. 生化实验方法和技术. 北京：高等教育出版社］

Zhu M X，1987. Application for Electronic Microscope to Biology. Beijing: Science Press.［朱明霞，1987. 生物学中电子显微镜应用. 北京：科学出版社］

Zhu S J，Wang J X，Si Z D，1997. Lysogeny of *Bacillus thuringiensis*. *Microbes for Pesticides*，1: 88－90.［朱素娟，王家驯，司稚东，1997. 苏云金杆菌的溶源性. 杀虫微生物，1：88－90］